昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, November 2015, 58(11): 1167 - 1176 doi:10.16380/j.kcxb.2015.11.003

桃蛀螟性信息素结合蛋白 Cpun-PBP1 的 cDNA 克隆、表达谱及其与配体化合物的结合特性分析

贾小俭[1,2], 郝少东[2], 杜艳丽[2,*], 张民照[2], 覃晓春[2], 王进忠[2], 王海香[1], 冀卫荣[1,*]

(1. 山西农业大学林学院, 山西太谷 030801; 2. 北京农学院植物科学技术学院, 农业应用新技术重点实验室, 北京 102206)

摘要:【目的】为了更好地了解性信息素结合蛋白(pheromone binding proteins, PBPs)在桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis* (Guenée)嗅觉识别过程中的作用,明确其与配体化合物的结合特性。【方法】本研究利用 RT-PCR 结合 RACE 方法克隆了桃蛀螟一个性信息素结合蛋白基因;采用 Real-time PCR 方法分析了该蛋白在桃蛀螟不同发育阶段及雌雄蛾间的表达差异;利用荧光竞争结合实验对 Cpun-PBP1 蛋白与 16 种配基化合物的结合特性进行了分析。【结果】克隆了一个桃蛀螟性信息素结合蛋白基因,命名为 *Cpun-PBP1*(GenBank 登录号:KP027486)。*Cpun-PBP1* 开放阅读框全长 510 bp,编码 169 个氨基酸,预测分子量为 19.12 kDa,等电点为 5.09,N-末端包括由起始位置开始的 30 个氨基酸组成的信号肽。蛋白特征分析显示,该氨基酸序列具有昆虫气味结合蛋白的典型特征,即含有 6 个保守的半胱氨酸残基。*Cpun-PBP1* 在桃蛀螟成虫阶段表达量最高,且几乎全部在触角中表达,卵期微量表达,幼虫期和蛹期均不表达。通过构建 *Cpun-PBP1* 原核表达载体,诱导并获得 Cpun-PBP1 重组蛋白。荧光竞争结合实验对 2 种性信息素组分和 14 种寄主植物挥发物的结合力发现,Cpun-PBP1 不但能有效地与桃蛀螟性信息素组分(顺-10-十六碳烯醛和十六醛)结合,结合常数分别为 7.32 和 9.39 μmol/L;还能与 8 种寄主植物挥发物有效结合;其中,与莰烯的结合能力最强,结合常数为 3.76 μmol/L。【结论】根据这些结果,我们推测 Cpun-PBP1 在桃蛀螟感受性信息素和寄主植物挥发物的过程中发挥着双重作用。

关键词: 桃蛀螟; 性信息素结合蛋白; 基因克隆; 表达谱分析; 原核表达; 荧光竞争结合

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2015)11-1167-10

cDNA cloning, expression profiling and binding affinity assay of the pheromone binding protein Cpun-PBP1 in the yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae)

JIA Xiao-Jian[1,2], HAO Shao-Dong[2], DU Yan-Li[2,*], ZHANG Min-Zhao[2], QIN Xiao-Chun[2], WANG Jin-Zhong[2], WANG Hai-Xiang[1], JI Wei-Rong[1,*] (1. College of Forestry, Agricultural University of Shanxi, Taigu, Shanxi 030801, China; 2. Beijing Key Laboratory for Agricultural Application and New Technique, College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract:【Aim】This study aims to study the function and ligand binding characteristics of pheromone binding proteins (PBPs) in the olfactory system of the yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis* (Guenée).【Methods】A cDNA encoding pheromone binding protein of *C. punctiferalis* was cloned by RT-PCR and RACE. The expression pattern of the PBP gene in different sexes and developmental stages of *C. punctiferalis* was analyzed by real-time PCR, and the protein binding affinity was analyzed using fluorescence competitive binding assay.【Results】A novel PBP cDNA was obtained from *C. punctiferalis* and named as *CpunPBP1* (GenBank accession no. KP027486). Its open reading frame is 510 bp in length, encoding a protein of 169 amino acids with the predicted molecular weight of 19.12 kDa and the

基金项目: 北京市教育委员会科技计划项目(KZ20120020019); 北京市农委项目(20140127)

作者简介: 贾小俭, 女, 1989 年 8 月生, 河北邯郸人, 研究方向为昆虫与害虫防治, E-mail: jiaxiaojian0@163.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: yanlidu@126.com; jiweirong@hotmail.com

收稿日期 Received: 2015-06-28; 接受日期 Accepted: 2015-08-20

isoelectric point of 5.09. The 30 amino residues at the N-terminal hydrophobic region display the characteristics of a signal peptide. Protein signature analysis revealed that *Cpun-PBP*1 shares the typical structural features of odorant binding proteins with other insects, including six conservative cysteine residues. Real-time quantitative PCR results indicated that *CpunPBP*1 was dominantly expressed in adult antennae, whereas scarcely expressed in egg stage and not expressed in larval and pupal stages. In addition, the recombinant protein of CpunPBP1 was prokaryotically expressed in *Escherichia coli* and purified. The binding affinity of CpunPBP1 to two sex pheromones and 14 plant volatiles showed that CpunPBP1 had a strong capability of binding two pheromone odorants (*cis*-10-hexadecenal and hexadecanoyl), with the binding constants of 7.32 and 9.39 μmol/L, respectively. Especially, CpunPBP1 could also bind with 8 plant volatiles, with the highest binding specificity to camphene (the binding constant: 3.76 μmol/L).【Conclusion】Based on these results, we inferred that CpunPBP1 play important roles in the process of discriminating odorants of pheromones and host plant volatiles of *C. punctiferalis*.

Key words: *Conogethes punctiferalis*; pheromone binding protein (PBP); gene cloning; expression pattern analysis; prokaryotic expression; fluorescence competitive binding assay

嗅觉系统对于昆虫寻找寄主、配偶、食物和繁殖等至关重要(Field *et al*., 2000)。研究表明,气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)是一类低分子量的水溶性酸性蛋白,主要位于昆虫触角感器淋巴液中。OBPs 与脂溶性的气味分子结合为复合物后,可穿过亲水性的感器淋巴液,到达嗅觉神经元上的气味受体,并激活嗅觉受体(olfactory receptors, ORs),被激活的 ORs 可将外界化学信号转化成电生理信号,通过轴突传到昆虫中枢神经系统,并在昆虫大脑中进行整合,由大脑发出指令,引发昆虫作出行为反应(Ishida and Leal, 2005; Leal *et al*., 2005; Leal, 2013)。根据氨基酸序列同源性的比对结果,将昆虫气味结合蛋白分为性信息素结合蛋白(pheromone binding proteins, PBPs)、普通气味结合蛋白(general odorant binding proteins, GOBPs)和触角结合蛋白(antennal-binding proteins, ABPs)三大类(Vogt, 1999)。Vogt 和 Riddiford(1981)在多音天蚕 *Antheraea polyphemus* 雄性触角中发现了第一个气味结合蛋白基因,并因其特异性结合性信息素组分而命名为性信息素结合蛋白。近年来,随着分子生物学技术的发展,已从多种蛾类昆虫体内克隆得到 PBPs 基因,如亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Allen and Wanner, 2011)、脐橙螟 *Amyelois transitella* (Leal *et al*., 2009)、烟青虫 *Helicoverpa assulta* (Liu *et al*., 2006)、小地老虎 *Agrotis ipsilon* (Picimbon and Gadenne, 2002)、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Xiu *et al*., 2008)、小菜蛾 *Plutella xylostella* (Mitsuno *et al*., 2008; Zhang *et al*., 2009; Sun *et al*., 2013)等。PBPs 具有高度专一性和敏感性,不但有助于同种昆虫间的信息交流,更有利于种群繁殖(Xu *et al*., 2013)。目前,荧光竞争结合试验已被广泛应用于昆虫气味结合蛋白与各种气味分子特异性结合能力的研究中(Pelosi *et al*., 2006; Qiao *et al*., 2009; Gu *et al*., 2013; 魏丹等, 2013; 宋月芹等, 2014)。

桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis* (Guenée)隶属于鳞翅目螟蛾科,其食性杂,分布广,寄主植物包括板栗 *Castanea mollissima*、桃 *Amygdalus persica*、玉米 *Zea mays*、向日葵 *Helianthus annuus* 等 40 多种果树、林木和农作物。近年来,桃蛀螟的发生危害逐年加重,造成巨大经济损失(杜艳丽等, 2012, 2014a, 2014b)。然而,由于其钻蛀为害的特性,使用化学农药不仅防治效果不佳,而且会对环境造成严重污染。性信息素防治技术高效、无毒、无残留,且具有较高的特异性和敏感性,不易引起害虫抗性,在生产中多用于监测和诱杀害虫(Witzgall *et al*., 2010)。然而,有关桃蛀螟 PBPs 的基础研究甚少,因此,本研究通过克隆桃蛀螟 *Cpun-PBP*1 基因,利用 Real-time PCR 技术对 *Cpun-PBP*1 在桃蛀螟不同发育阶段及成虫期不同性别间的表达谱进行分析,继而采用原核表达及蛋白纯化得到 Cpun-PBP1 重组蛋白,通过荧光竞争结合实验测定 Cpun-PBP1 与 16 种气味化合物的结合能力,为探讨桃蛀螟感受气味化合物的分子响应机制提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

2009 年 10 月 9 日,在北京农学院玉米试验田

采集桃蛀螟老熟幼虫，在人工气候箱（RTOP-B，浙江托普仪器有限公司，中国）内用新鲜玉米饲养供实验所用。到本实验开始前，试虫已在北京农学院养虫室累计饲养 45 代左右，饲养方法同杜艳丽等（2012）。

1.2　RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

取羽化 3 d 的桃蛀螟雄虫触角 65 对，用液氮研磨为粉末，然后采用 RNeasy Plus Mini Kit（Qiagen Co.，德国）提取总 RNA，经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性后，用反转录试剂盒（Promega Co.，美国）合成 cDNA 第一链，−20℃保存备用。

1.3　桃蛀螟 PBP1 基因的克隆

以合成的 cDNA 第一链为模板，采用简并引物 F1 和 R1（表 1）进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50.0 μL，包括 21.3 μL ddH_2O，1.7 μL cDNA 模板和 25.0 μL 2 × Taq Mix，引物 F1 和 R1 各 1.0 μL。反应条件为：94℃预变性 5 min；94℃变性 40 s，45℃退火 40 s，72℃延伸 2 min，40 个循环；72℃延伸 5 min。利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，纯化回收目的片段。回收产物连接至 pMD-19T 载体（TaKaRa Co.，中国）上，转化至大肠杆菌 DH5α 中，在 37℃下涂平板、过夜培养 16 h 后，选取阳性克隆菌液送上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。

表 1　引物序列及用途

Table 1　Primers and its application

引物名称 Primers	引物序列 Primer sequences（5′−3′）	引物用途 Use of primers
F1	CTGGAAGGAAGGCTA	*PBP*1 片段克隆
R1	TCCATGCTSGGAGCCCA	cDNA cloning of *PBP*1 fragment
3′-GSP1	CGGCGGACTTCATCAAGCAACATGG	3′-RACE
3′-GSP2	CGCTGTTCCCAATGAGGACCACTGCA	
5′-GSP1	ACTCCCACTTCTCCCTCGCATCT	5′-RACE
5′-GSP2	GCCTCGTCTACGCCTCATCGTTC	
qActin-F	GGAAATCGTCCGCGACATCAA	Real-time PCR
qActin-R	CAGGAAGGAAGGCTGGAACAGG	
qPBP1-F	ACGGCGGACTTCATCAAGCAA	
qPBP1-R	CAGTGGTCCTCATTGGGAACAGC	
CpunPBP1-F	GGATCCATGTGGTTGAAAAATGTTATGGTC	原核表达
CpunPBP1-R	AAGCTTTCATCGTTCTGACATCTCAGCCA	Prokaryotic expression

下划线表示酶切位点。The restriction enzyme cutting site is underlined.

根据获得的桃蛀螟 PBP1 基因序列，设计并合成 3′和 5′RACE 引物（表 1），按照 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit（Clontech Co.，美国）的步骤，合成 cDNA 第一链，并进行 PCR 扩增，扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后回收纯化，并连接转化至 DH5α 感受态细胞，培养后进行测序。

1.4　桃蛀螟 *CpunPBP*1 序列分析

利用 DNAMAN 4.0 对桃蛀螟 *CpunPBP*1 序列进行分析，并通过在线软件（http：// www. Expasy. org/compute_pi/）对蛋白质的分子量和等电点等基本物理性状进行分析预测；蛋白质信号肽的分析使用 IPSORT（http：// www. ipsort. hgc. jp/）；系统发育树的构建使用 MEGA5.0，采用邻位相连法（neighbor joining，NJ）进行 1 000 次重复构建。

1.5　Real-time PCR

分别收集桃蛀螟卵、幼虫、蛹和去除触角的成虫，以及羽化后 1 和 4 d 的雌、雄蛾触角，并分别提取总 RNA，进行反转录（方法同 1.2 节）。根据已获得的 *Cpun-PBP*1 基因序列设计并合成引物 qPBP1F 和 qPBP1R，内参基因为 *β-actin*（GenBank 登录号为 JX119014.1）。Real-time PCR 反应体系为 20.0 μL，包括 7.2 μL ddH_2O，2.0 μL cDNA 模板，10.0 μL SYBR Premix Ex Taq（2 ×），引物各 0.4 μL。反应条件为 95℃变性 3 min；95℃变性 10 s，60℃退火后延伸 30 s，40 个循环。每种处理重复 3 次，以 ddH_2O 作为空白对照。

1.6　Cpun-PBP1 蛋白的原核表达及纯化

根据 *Cpun-PBP*1 基因编码区序列设计含有 *Bam*I 和 *Han*dIII 酶切位点的引物（表 1），并遵照宋月芹等（2014）的方法构建重组表达载体。将鉴定成功的重组质粒 pET-*CpunPBP*1 转化到 BL21 表达菌株，培养过夜后，挑取单菌落接种于 5 mL 的 LB 液体培养基（含 Kan 100 μg/mL）中过夜摇菌，次日按 1∶100 的比例将其转接到新鲜的 LB 液体培养基中，于 37℃180 r/min 振荡培养至 OD 值为 0.6 ~0.8 时，加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 6 h。期间，每隔 2 h 取菌液 1 mL，以未诱导菌液为阴性对

照,利用 SDS-PAGE 电泳检测不同时间段的诱导表达效果。

为分析 Cpun-PBP1 蛋白的表达形式,将诱导好的 *Cpun-PBP*1 大肠杆菌菌液收集在 50 mL 离心管中,离心 10 min(8 000 r/min),弃上清,加入细菌裂解液充分重悬菌体以超声破碎,于 4℃ 离心 10 min(12 000 r/min),分别取上清及沉淀进行 SDS-PAGE 电泳检测,并纯化重组蛋白 pET30a/Cpun-PBP1(据 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化说明),之后利用重组肠激酶(欣百诺生物,中国)对纯化好的蛋白进行酶切(37℃ 切割 16 h)以去除 His-tag,酶切后的重组蛋白经再次纯化后,利用超滤凝缩管(Millipore,截留分子量为 10 kDa)将蛋白浓缩至 1 mg/mL,于 -80℃保存备用。

1.7 荧光竞争结合试验

本研究测试了 Cpun-PBP1 与 16 种气味化合物(表 2)的荧光竞争结合特性,其中,顺-10-十六碳烯醛(*cis*-10-hexadecenal)和十六醛(hexadecanoyl)为桃蛀螟性信息素的主要组分(Liu *et al*., 1994),其他 14 种均为目前报道的桃蛀螟寄主植物主要挥发物(杜艳丽等, 2014a; 李得宇, 2014; 艾鹏鹏, 2015)。

将纯化好的蛋白 Cpun-PBP1 溶于 20 mmol/L 的 Tris-HCl(pH 7.4)缓冲液中,配成一定浓度的母液以便计算,荧光探针 1-NPN(Sigma Co., 德国)及气味物质溶于甲醇溶液中,配成终浓度为 1 mmol/L 的母液。

首先测定 Cpun-PBP1 与 1-NPN 的结合曲线。将蛋白溶液加入 Tris-HCl(20 mmol/L pH 7.4)缓冲液里,使其终浓度为 2 μmol/L,依次加入 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 和 20 μmol/L 荧光探针 1-NPN 反应 2 min后,激发波长为 337 nm,记录荧光值以检测该探针是否能用于荧光竞争结合实验,并计算该蛋白与 1-NPN 的结合常数。然后用同样的方法测定蛋白与气味物质的结合能力,结合能力差异依据结合常数 K_i 值来比较,一般情况下,若 $K_i < 10$ μmol/L,即认为该配基与 OBPs 的结合能力较强(Pelosi *et al*., 2006)。计算公式为 $K_i = [IC_{50}]/(1 + [1\text{-NPN}]/K_{1\text{-NPN}})$(Ban *et al*., 2003; 宋月芹等, 2014),其中[1-NPN]为未结合的 1-NPN 浓度, $K_{1\text{-NPN}}$ 为 *Cpun-PBP*1/1-NPN 蛋白的结合常数。实验中每个处理重复 3 次。

1.8 数据统计与分析

在 Real-time qPCR 测定中,根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法对不同样品中 *Cpun-PBP*1 的表达量进行计算(Schmittgen and Livak, 2008)。所得数据采用 SPSS 19.0进行单因素方差分析(ANOVA, LSD, $P < 0.05$)。

2 结果

2.1 桃蛀螟 *CpunPBP*1 基因扩增产物的克隆及鉴定

用简并引物进行 PCR 扩增,获得一段长度为 290 bp 的 PCR 产物(图 1)。利用该序列设计特异性引物进行巢式 PCR 扩增,在 3′和 5′RACE 中分别获得 820 和 750 bp 两个片段(图 1)。通过序列拼接得到 1 122 bp 的 *Cpun-PBP*1 cDNA 全长序列。

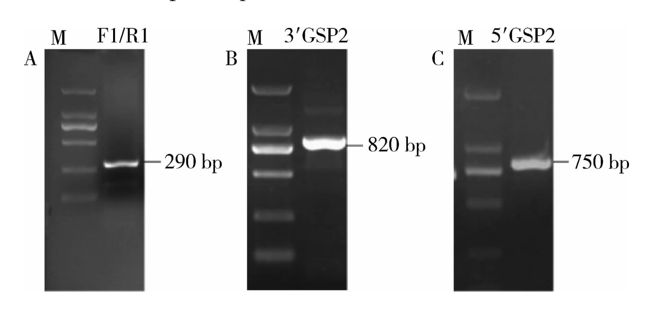


图 1 桃蛀螟 *CpunPBP*1 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of PBP1 gene from *Conogethes punctiferalis* (*CpunPBP*1)

M: DNA 分子量标准 DL2000; A: 简并引物扩增片段 PCR product of the *PBP*1 fragment amplified with degenerate primer (F1/R1); B: 3′RACE第 2 轮产物 Next PCR product in 3′RACE (3′GSP2); C: 5′RACE第 2 轮产物 Next PCR product in 5′RACE (5′GSP2).

2.2 桃蛀螟 *CpunPBP*1 基因氨基酸序列分析

本研究从桃蛀螟触角中克隆得到一个新的气味结合蛋白基因,命名为 *Cpun-PBP*1(GenBank 登录号为 KP027486 和 KP027487)。*Cpun-PBP*1 开放阅读框全长 510 bp,编码 169 个氨基酸,分子量 19.12 kDa,等电点 5.09,N-末端包括由起始位置开始的 30 个氨基酸组成的信号肽(图 2)。

用 Kyte 和 Doolittle(1982)的方法对推测的 Cpun-PBP1 氨基酸序列进行亲脂性分析,发现 Cpun-PBP1 氨基酸序列中含有较多的亲脂性氨基酸,以第 70 - 80 位和第 120 - 140 位的亲脂性较强,推测其可能是 Cpun-PBP1 与脂溶性气味物质的结合位点(图 3)。

2.3 桃蛀螟 CpunPBP1 与其他昆虫气味结合蛋白氨基酸序列比对和系统发育关系分析

通过与螟蛾科昆虫的 PBPs 氨基酸序列进行比对,结果显示:Cpun-PBP1 氨基酸序列含有 6 个保守的半胱氨酸残基(Cys1-X30-Cys2-X3-Cys3-X42-Cys4-X10-Cys5-X8-Cys6),且第 2 个半胱氨酸前面含

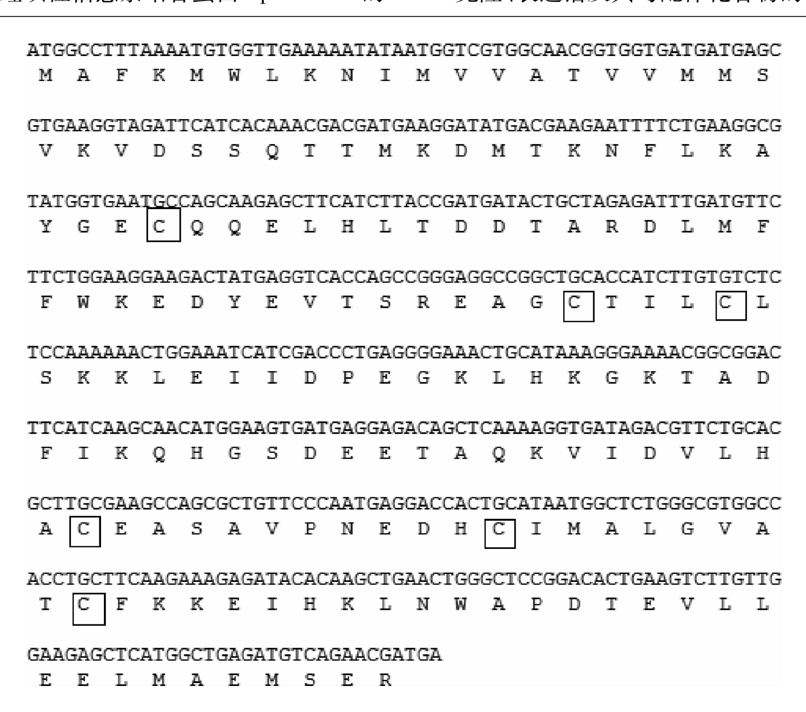


图 2　桃蛀螟 *CpunPBP*1 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2　Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Cpun-PBP*1 gene from *Conogethes punctiferalis*

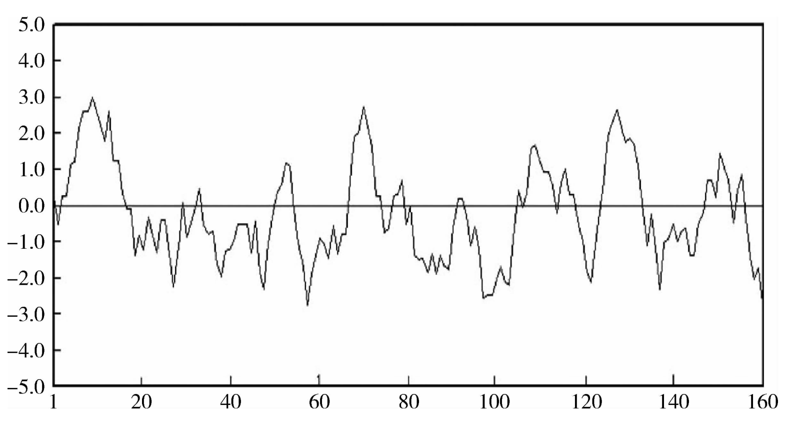


图 3　桃蛀螟 CpunPBP1 氨基酸亲脂性分析

Fig. 3　Predicted hydropathy profiles for the amino acid sequences of Cpun-PBP1 from *Conagethes punctieralis*

氨基酸位点的亲和指数根据 Kyte 和 Doolittle(1982)的方法计算，正数代表亲脂性，负数代表亲水性。Values of hydrophobicity index are plotted against the amino acid residues using the method of Kyte and Doolittle (1982). Positive values indicate hydrophobicity while negative values indicate hydrophobicity.

有一个甘氨酸残基，与本文所比对的其他螟蛾科昆虫的 PBPs 相似(图 4)。

采用 NJ 法(MEGA5.0)对螟蛾科 10 种昆虫的 PBPs 构建系统进化树，可以看出：CpunPBP1 与瓜绢野螟 DindPBP 聚在同一个分支上，并且 DNAMAN 4.0 软件比对结果显示 CpunPBP1 与瓜绢野螟 DindPBP 的同源性最高，氨基酸序列一致性为 73.0%(图 5)。

2.4　桃蛀螟 *Cpun-PBP*1 基因的转录表达谱分析

桃蛀螟 *Cpun-PBP*1 基因在其不同发育阶段的表达水平存在差异(图 6)，其中，成虫触角中的表达量最高，卵期仅有微量表达，幼虫期和蛹期均不表达；另外，1 日龄雄蛾触角中的表达量最高，分别是 4 日龄雄蛾、4 日龄雌蛾和 1 日龄雌蛾触角中表达量的 1.32、1.33 和 3.15 倍。1 日龄雄蛾触角中的表达量显著高于卵期及去除触角的雄蛾，但雌雄蛾间无显著差异。

2.5　Cpun-PBP1 蛋白的表达与纯化

通过摸索 Cpun-PBP1 的诱导表达条件，发现在 IPTG 浓度为 1 mmol/L，温度为 37℃，诱导时间为6 h，转速为 180 r/min 的条件下蛋白表达量最大。

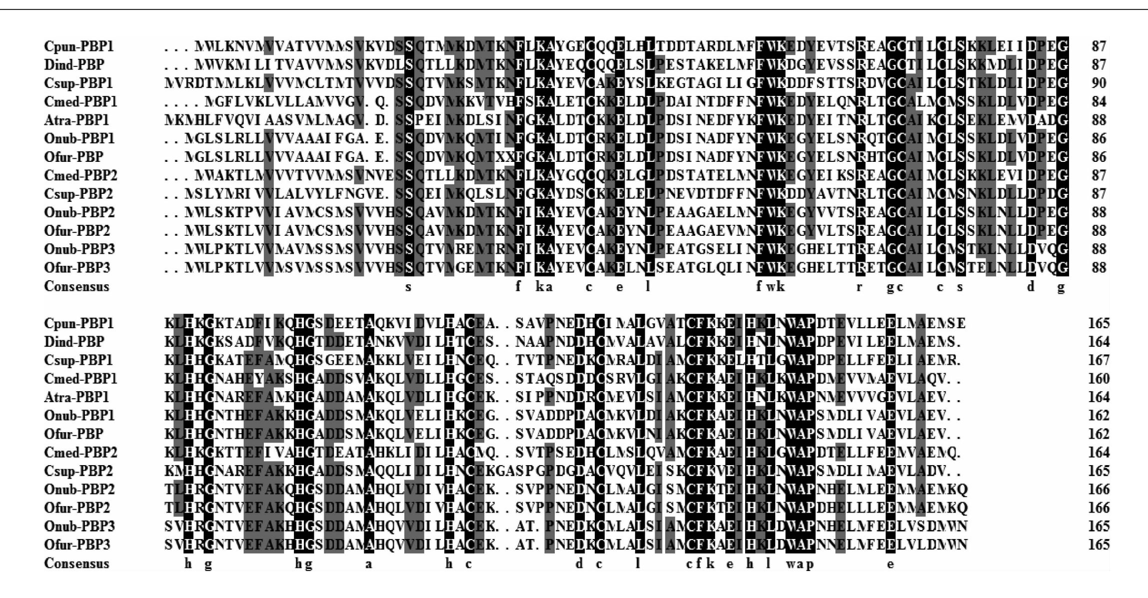


图 4 桃蛀螟与螟蛾科其他昆虫的性信息素结合蛋白氨基酸序列多重比对

Fig. 4 Alignment of the amino acid sequences of PBPs from *Conogethes punctiferalis* and other Crambidae insects

PBP 氨基酸序列来源及 GenBank 登录号 The origin of the PBPs and their GenBank accession numbers：Cpun：桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis*（Cpun-PBP1：KP027486，KP027487）；Dind：瓜绢野螟 *Diaphania indica*（Dind-PBP：BAG71419.1）；Csup：二化螟 *Chilo suppressalis*（Csup-PBP1：ADK66921.1；Csup-PBP2：ACJ07123.1）；Atra：脐橙螟 *Amyelois transitella*（Atra-PBP1：ACX47890.1）；Cmed：稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis*（Cmed-PBP1：AFG72999.1）；Cmed：稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis*（Cmed-PBP2：AGI37364.1）；Onur：欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis*（Onur-PBP1：ADT78495.1；Onur-PBP2：ADT78490.1；Onur-PBP3：ADT78492.1）；Ofur：亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*（Ofur-PBP：AAD39442.1；Ofur-PBP2：ADT78501.1；Ofur-PBP3：ADT78502.1）. 图 5 同 The same for Fig. 5.

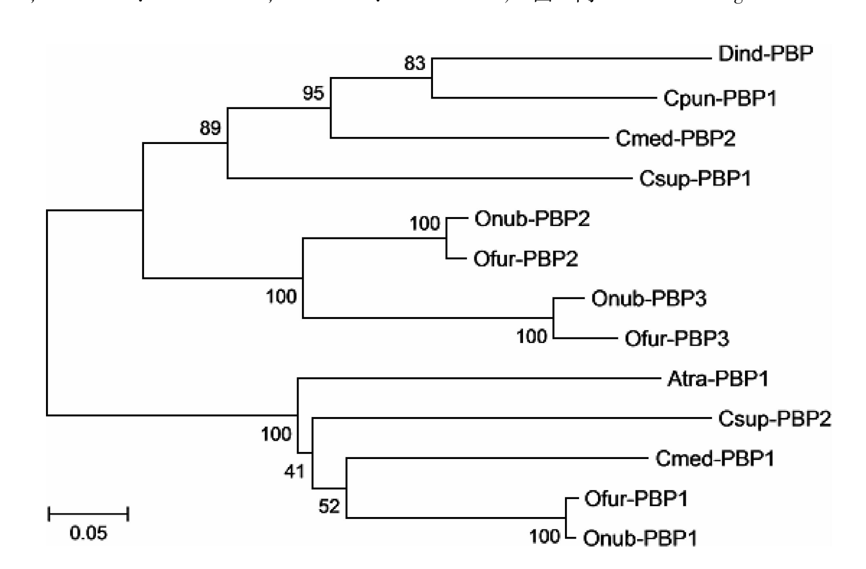


图 5 桃蛀螟与螟蛾科其他昆虫 PBPs 氨基酸的系统发育树(邻接法)

Fig. 5 Phylogenetic tree of PBPs from *Conogethes punctiferalis* and other insects in the family of Crambidae based on amino acid sequences (neigbor-joining method)

图中数字为 Bootstrap 检验值,标尺示遗传距离。Numerals in the figure are bootstrap values. The scale bar indicates the genetic distance.

SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白条带大约位于 24 kDa 左右。对该蛋白进行超声破碎并离心,取上清和沉淀经 SDS-PAGE 检测发现,Cpun-PBP1 主要以包涵体蛋白的形式表达(图 7),所以通过尿素变性、纯化及透析复性后用重组肠激酶切除 His-tag 标签,对切除标签后的目的蛋白再次纯化,获得大小约为 19 kDa 目的蛋白条带(图 7)。

2.6 Cpun-PBP1 蛋白与不同气味物质结合能力的测定

根据 Scachard 方程将 Cpun-PBP1 与 1-NPN 的结合曲线线性化,得出该蛋白与 1-NPN 的结合常数为 3.628 μmol/L(图 8)。采用荧光竞争结合实验测

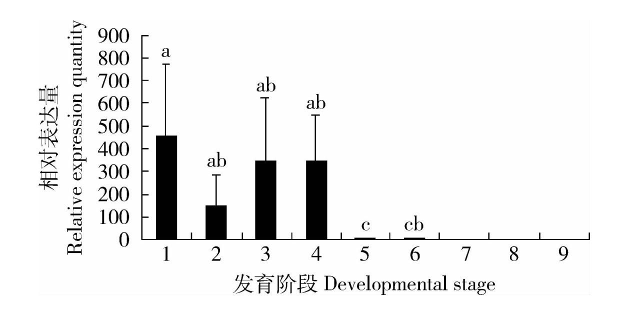


图 6　*Cpun-PBP* 基因在桃蛀螟不同发育阶段的虫体和不同日龄成虫触角中表达谱

Fig. 6　Relative expression level of *CpunPBP*1 in bodies at different developmental stages and antennae of different day-old adults of *Conogethes punctiferalis*

1：1 日龄雄成虫触角 1-day-old male adult antenna；2：1 日龄雌成虫触角 1-day-old female adult antenna；3：4 日龄雄成虫触角 4 day-old male adult antenna；4：4 日龄雌成虫触角 4 day-old female adult antenna；5：卵 Egg；6：去除触角的雄成虫 Male adult without antenna；7：幼虫 Larva；8：蛹 Pupa；9：去除触角的雌成虫 Female adult without antenna. 图中数据为平均值 ± 标准误，柱上不同字母示不同发育阶段的表达量存在显著差异（$P < 0.05$）（采用最小显著差法 LSD）。Data in the figure are mean ± *SE*. Different letters above bars indicate significant difference in the expression level among different developmental stages at the 0.05 level (LSD's test).

定了 Cpun-PBP1 与 16 种挥发性气味物质的结合能力（图 9，表 2），结果显示该蛋白可与其中的 10 种气味分子相结合。其中，与莰烯的结合能力最强，结合常数为 3.76 μmol/L；其次为顺-10-十六碳烯醛、3-蒈烯和十六醛，结合常数分别为 7.32，8.68 和 9.39 μmol/L。

表 2　桃蛀螟 Cpun-PBP1 与气味标样的结合能力

Table 2　Binding specificity of ligands to Cpun-PBP1 from *Conogethes punctiferalis*

气味标样 Ligands	CAS 登记号 CAS No.	IC_{50} (μmol/L)	K_i (μmol/L)
反-4-葵烯酸乙酯 Ethyl *trans*-4-decenoate	76649-16-6	13.75	10.16
2-甲基丁酸甲酯 Methyl 2-methylbutyrate	868-57-5	–	–
2-甲基丁酸乙酯 Ethyl 2-methylbutyrate	7452-79-1	–	–
丁酸乙酯 Ethyl butyrate	105-54-4	20.20	14.92
2-甲基丁醇 2-Methyl-1-butanol	137-32-6	22.59	16.69
己酸乙酯 Ethyl hexanoate	123-66-0	–	–
辛酸乙酯 Ethyl caprylate	106-32-1	–	–
苯乙烯 Styrene	100-42-5	–	–
乙酸戊酯 Pentyl acetate	628-63-7	20.17	14.90
3-蒈烯 3-Carene	013466-78-9	11.74	8.68
桉叶油醇 Eucalyptol	000470-82-6	–	–
α-蒎烯 α-Pinene	007785-70-8	22.46	16.59
莰烯 Camphene	000079-92-5	5.08	3.76
桧烯 Sabinene	003387-41-5	21.31	15.74
顺-10-十六碳烯醛 *cis*-10-Hexadecenal	53939-28-1	9.90	7.32
十六醛 Hexadecanoyl	629-80-1	12.70	9.39

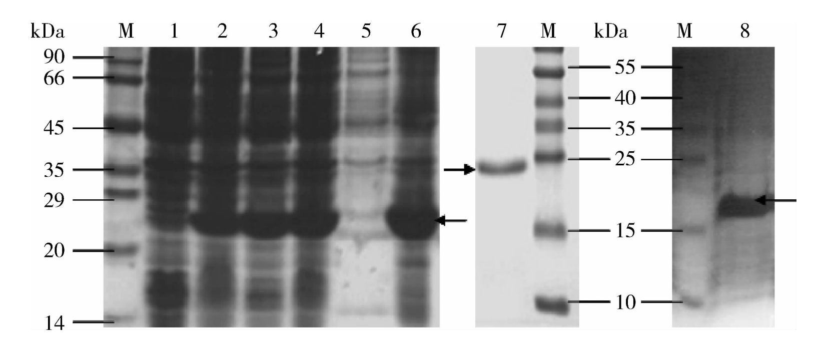


图 7　桃蛀螟 *Cpun-PBP*1 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 7　SDS-PAGE analysis of recombinant *Cpun-PBP*1 from *Conogethes punctieralis*

M：蛋白标准分子量 Protein molecular weight marker；1：未经 IPTG 诱导的 pET/*Cpun-PBP*1 Expressed product of pET/*Cpun-PBP*1 non-induced by IPTG；2 –4：分别经 IPTG 诱导 2，4 和 6 h 的 pET/*Cpun-PBP*1 Expressed product of pET/*Cpun-PBP*1 induced by IPTG for 2，4 and 6 h；5：pET/*Cpun-PBP*1 经超声破碎后的上清 Supernatant of pET/*Cpun-PBP*1 after sonication；6：pET/*Cpun-PBP*1 经超声破碎后的沉淀 Pellet of pET/*Cpun-PBP*1 after sonication；7：纯化后的蛋白 Cpun-PBP1 Purified Cpun-PBP1 protein；8：重组肠激酶切除 His-tag 标签后的蛋白 Purified Cpun-PBP1 with His-tag removed by recombinant enterokinase. 箭头指示目的条带。The target bands are marked by arrows.

3　讨论

气味结合蛋白在昆虫雌雄触角中均有表达，能很好地感知和识别外界气味分子变化，在昆虫寄主定位过程中起着重要作用（Qiao *et al*., 2009；Zhou *et al*., 2009）。本文利用 RACE 和 RT-PCR 技术，首次克隆了桃蛀螟一个新的气味结合蛋白基因 *Cpun-PBP*1。

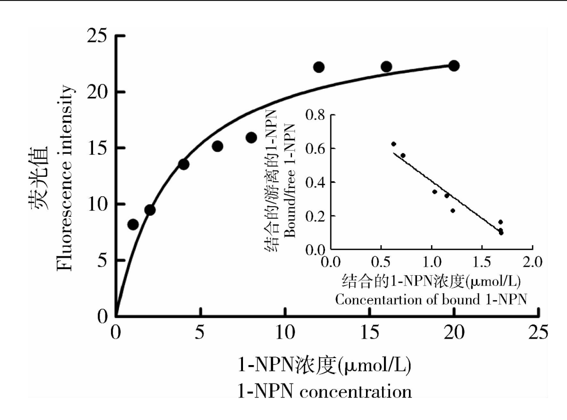


图 8 1-NPN 与 Cpun-PBP1 蛋白的结合曲线

Fig. 8 Binding curve of 1-NPN and Cpun-PBP1

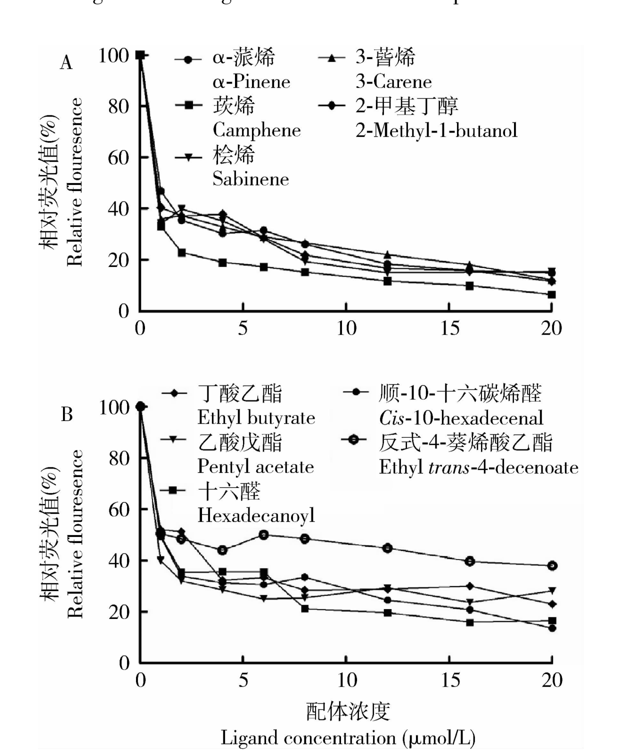


图 9 气味标样与 Cpun-PBP1 蛋白的结合曲线

Fig. 9 Competitive binding curves of ligands to Cpun-PBP1

该基因编码的蛋白具有 6 个保守的半胱氨酸残基，可用 Cys1-X30-Cys2-X3-Cys3-X42-Cys4-X10-Cys5-X8-Cys6 表示，符合 Xu 等(2009)鉴别鳞翅目昆虫 PBPs 的经典模式(Cys1-X25-30-Cys2-X3-Cys3-X36 ~ 42-Cys4-X8-14-Cys5-X8-Cys6)。通过将 Cpun-PBP1 与螟蛾科其他昆虫的 PBPs 进行多重比对，发现第 2 个保守的半胱氨酸前面均有一个甘氨酸残基，推测该甘氨酸位点与鳞翅目昆虫的嗅觉识别功能有关。根据 Kyte 和 Doolittle(1982)的方法对氨基酸序列进行亲脂性分析，发现 Cpun-PBP1 有多个较强的亲脂性区域，与已报道的苜蓿盲蝽 AlinOBP1 的亲脂性区域相似(谷少华等，2010)，推测该区域可能是脂溶性气味分子的结合位点。序列比对和系统发育关系表明：本文所比对的螟蛾科昆虫性信息素结合蛋白中，CpunPBP1 与瓜绢野螟 DindPBP 聚在同一分支上；在序列多重比对中，二者的同源性也最高。这从一定程度上说明亲缘关系越近，气味结合蛋白间的核苷酸序列相似性越高，同时暗示这两种气味结合蛋白在桃蛀螟与瓜绢野螟对性信息素的嗅觉识别过程中具有类似功能。

对于鳞翅目昆虫而言，PBPs 多在成虫期表达，而卵期和蛹期仅有微量表达，幼虫期几乎不表达(李亮等，2009)。本研究中，*CpunPBP1* 在桃蛀螟成虫阶段的表达量最高，卵期微量表达，幼虫期和蛹期均不表达，说明该基因在成虫求偶过程中起着非常关键的作用。同时，推测 *CpunPBP1* 在卵期的微量表达是由于雌蛾产卵时随卵分泌，用以调节同种雌虫在寄主植物的不同部位产卵，从而避免后代对食物的过度竞争(魏丹等，2013)。另外，据报道，PBPs 与雄蛾感知雌蛾释放的性信息素组分有关，因而通常在雄蛾触角中的表达量较高(Allen and Wanner, 2011; Gu *et al.*, 2013)，当然，有的种类雌蛾触角中也有表达(Rivière *et al.*, 2003)。本研究中，*CpunPBP1* 在桃蛀螟成虫阶段几乎全部在触角中表达，但雌雄蛾触角间无显著差异。据杜艳丽等(2012)报道，桃蛀螟成虫羽化后第 2 天开始交配，第 3 天后进行产卵，该蛋白在 1 日龄雄蛾触角中的表达量远高于 4 日龄雄蛾触角中的表达量，说明该蛋白的表达量在雄蛾交配之后降低，暗示了 *CpunPBP1* 在雄蛾求偶过程中起着感受雌蛾性信息素的作用，与 Baker 等(2004)的研究结果一致。

研究发现，GOBPs 除了能与普通气味分子结合外，也能显著结合性信息素化合物；另外，PBPs 不但能特异性结合性信息素化合物，也能结合普通气味分子(Lautenschlager *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009; He *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013)。在本研究所测试的 16 种气味化合物中，桃蛀螟 Cpun-PBP1 不但可与供试的 2 种性信息素化合物(顺-10-十六碳烯醛和十六醛)相结合，而且可选择性地与 8 种寄主植物挥发物结合，这与之前有关家蚕 *Bombyx mori* 和小地老虎 *Agrotis ipsilon* 等昆虫 PBPs 与气味分子结合功能的研究结果一致(Lautenschlager *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2013)，推测 Cpun-PBP1 在桃蛀螟感受性信息素和植物挥发物的过程中发挥着双重作用。

据报道，大部分鳞翅目昆虫有 3 个 PBPs 基因

（*PBP*1，*PBP*2 和 *PBP*3），不同的 PBPs 与各种气味物质的结合能力强弱存在差异（Gong *et al*., 2009；Gu *et al*., 2013；Sun *et al*. 2013）。本研究中 Cpun-PBP1 与莰烯的结合能力高于两种性信息素组分，推测虽然 Cpun-PBP1 为桃蛀螟 PBPs 家族中的一员，但在识别供试的两种性信息素过程中并不起主要作用。另外，板栗为桃蛀螟最适宜的寄主植物之一（Li *et al*., 2015），不同板栗品种所释放的挥发性气味化合物中莰烯含量均为最高，推测莰烯为栗园中引诱桃蛀螟的主要化学物质（杜艳丽，2014a）。在本研究所供试的 14 种寄主植物挥发物中，莰烯与 Cpun-PBP1 的结合能力最强；同时，*Cpun-PBP*1 在 4 日龄雌蛾触角中的表达量是 1 日龄雌蛾中的表达量的 3.4 倍，且 4 日龄雌蛾基本均已完成交配（Li *et al*., 2015），推测 Cpun-PBP1 可能与受孕桃蛀螟雌蛾进行寄主定位和寻找产卵场所的行为有关，即具有普通气味结合蛋白的功能。另外，丁酸乙酯、乙酸戊酯、反-4 葵烯酸乙酯、2-甲基丁醇、桧烯和 α-蒎烯等 6 种挥发物与 Cpun-PBP1 的结合能力一般（结合常数均大于 10 μmol/L）；而其他 6 种挥发物（2-甲基丁酸甲酯、2-甲基丁酸乙酯、乙酸己酯、辛酸乙酯、苯乙烯和桉叶油醇）与 Cpun-PBP1 不结合，说明虽然 Cpun-PBP1 与挥发性气味物质的结合谱较广，但又具有一定的选择性和结合特异性，即不同气味对于同一种气味结合蛋白可能表现出不同的功能，昆虫需要依靠多种气味结合蛋白与植物挥发性化合物的相互作用对寄主进行定位、产卵、危害等（孙红岩等，2011）。

参考文献（References）

Ai PP, 2015. Release Pattern of Volatiles from Apples Inoculated with Penicillium, with Attraction to the Yellow Peach Moth, *Conogethes punctiferalis* (Guenée). MSc Thesis, Beijing Agricultural College, Beijing. [艾鹏鹏，2015. 青霉菌诱导的苹果挥发物释放规律及桃蛀螟行为趋向反应. 北京：北京农学院硕士学位论文]

Allen JE, Wanner KW, 2011. Asian corn borer pheromone binding protein 3 a candidate for evolving specificity to the 12-tetradecenyl acetate sex pheromone. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 41: 141–149.

Baker TC, Ochieng SA, Cosse AA, Lee SG, Todd JL, Quero C, Vickers NJ, 2004. A comparison of responses from olfactory receptor neurons of *Heliothis subflexa* and *Heliothis virescens* to components of their sex pheromone. *J. Comp. Physiol*., 190: 155–165.

Ban L, Scalonib A, Brandazza A, Angeli S, Zhang L, Yan Y, Pelosi P, 2003. Chemosensory proteins of *Locusta migratoria*. *Insect Mol. Biol*., 12(2): 125–134.

Du YL, Guo HM, Sun SL, Zhang MZ, Zhang AH, Wang JB, Qin L, 2012. Effects of temperature on the development and reproduction of the yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis*. *Acta Entomologica Sinica*, 55(5): 561–569. [杜艳丽，郭洪梅，孙淑玲，张民照，张爱环，王金宝，秦岭，2012. 温度对桃蛀螟生长发育和繁殖的影响. 昆虫学报，55(5)：561–569]

Du YL, Zhang JX, Yang MM, Sun SL, Qin L, Wang JB, Zhang ZY, 2014a. Volatiles from involucres of chestnut and their potential applications in control of *Conogethes punctiferalis*. *Chinese Journal of Ecology*, 33: 2096–2100. [杜艳丽，张佳鑫，杨萌萌，孙淑玲，秦岭，王金宝，张志勇，2014a. 栗苞挥发物成分及其在桃蛀螟防治中的潜在应用. 生态学杂志，33：2096–2100]

Du YL, Zhang MZ, Ma YQ, Sun SL, Wang JB, Liu JL, Qin L, 2014b. Formulation screening of sex pheromones and field trapping tests for the yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Phytophylacica Sinica*, 41: 187–191. [杜艳丽，张民照，马永强，孙淑玲，王金宝，刘建玲，秦岭，2014b. 桃蛀螟性诱剂配方筛选与田间引诱试验. 植物保护学报，41：187–191]

Field LM, Pickett JA, Wadhams LJ, 2000. Molecular studies in insect olfaction. *Insect Mol. Biol*., 9: 545–551.

Gong ZJ, Zhou WW, Yu HZ, Mao CG, Zhang CX, Cheng JA, Zhu ZR, 2009. Cloning, expression and functional analysis of a general odorant-binding protein 2 gene of the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). *Insect Mol. Biol*., 18: 405–417.

Gu SH, Zhang XY, Zhang YJ, Wu KM, Guo YY, 2010. Cloning and expression pattern analysis of an odorant binding protein gene *Alin-OBP*1 in the Lucerne plant bug, *Adelphocoris lineolatus* (Goeze) (Hemiptera: Miridae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(5): 487–496. [谷少华，张雪莹，张永军，吴孔明，郭予元，2010. 苜蓿盲蝽气味结合蛋白基因 *Alin-OBP*1 的克隆及表达谱分析. 昆虫学报，53(5)：487–496]

Gu SH, Zhou JJ, Wang GR, Zhang YJ, Guo YY, 2013. Sex pheromone recognition and immunolocalization of three pheromone binding proteins in the black cutworm moth *Agrotis ipsilon*. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 43: 237–251.

He X, Tzotzos G, Woodcock C, Pickett JA, Hooper T, Field LM, Zhou JJ, 2010. Binding of the general odorant binding protein of *Bombyx mori* BmorGOBP2 to the moth sex pheromone components. *J. Chem. Ecol*., 36: 1293–1305.

Ishida Y, Leal WS, 2005. Rapid inactivation of a moth pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 14075–14079.

Kyte J, Doolittle RF, 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol*., 157: 105–132.

Lautenschlager C, Leal WS, Clardy J, 2007. *Bombyx mori* pheromone-binding protein binding nonpheromone ligands: implications for pheromone recognition. *Structure*, 15: 1148–1154.

Leal WS, 2005. Pheromone reception. The chemistry of pheromones and other semio chemicals II. *Top. Curr. Chem*., 240: 1–36.

Leal WS, 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol*., 58: 373–379.

Leal WS, Ishida Y, Pelletier J, Xu W, Rayo J, Xu X, Ames JB, 2009. Olfactory proteins mediating chemical communication in the navel orange worm moth, *Amyelois transitella*. *PLoS ONE*, 4: e7235.

Li DY, 2014. Effects of Volatiles from Peach and Plum on Host Location of the Yellow Peach Moth, *Conogethes punctiferalis* (Guenée). MSc Thesis, Beijing Agricultural College, Beijing. [李得宇, 2014. 桃和李子挥发物对桃蛀螟的引诱作用. 北京: 北京农学院硕士学位论文]

Li DY, Ai PP, Du YL, Sun SL, Zhang MZ, 2015. Effects of different host plants on the development and reproduction of yellow peach moth, *Conogethes punctiferalis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Crambidae). *Austr. Entomol.*, 54: 149 – 153.

Li L, Yang WL, Guo XR, Luo MH, Yuan GH, Qiao Q, Fu XW, 2009. Cloning, sequence analysis and spatio-temporal expression of a pheromone binding protein 2 (PBP2) gene from *Helicoverpa assulta* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52 (11): 1199 – 1205. [李亮, 杨文玲, 郭线茹, 罗梅浩, 原国辉, 乔奇, 付晓伟, 2010. 烟夜蛾性信息素结合蛋白2(PBP2)基因的克隆、序列分析与时空表达. 昆虫学报, 52(11): 1199 – 1205]

Liu MY, Tian Y, Li Y, 1994. Identification of minor components of the sex pheromone of yellow peach moth, *Dichocrocis punctiferalis* (Guenée) and field trials. *Entomologica Sinica*, 1(2): 150 – 155.

Liu XG, An SU, Luo MH, Guo XR, Yuan GH, 2006. Cloning and sequencing of cDNA encoding pheromone binding protein 3 from the *Helicoverpa assulta* (Guenée) and its expression in *Escherichia coli*. *Acta Entomologica Sinica*, 49(5): 733 – 739. [刘晓光, 安世恒, 罗梅浩, 郭线茹, 原国辉, 2006. 烟实夜蛾信息素结合蛋白3 cDNA 的克隆、序列分析与原核表达. 昆虫学报, 49(5): 733 – 739]

Mitsuno H, Sakurai T, Murai M, Yasuda T, Kugimiya S, Ozawa R, Toyohara H, Takabayashi J, Miyoshi H, Nishioka T, 2008. Identification of receptors of main sex-pheromone components of three lepidopteran species. *Eur. J. Neursci.*, 28: 893 – 902.

Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvello M, 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63(14): 1658 – 1676.

Picimbon JF, Gadenne C, 2002. Evolution of noctuid pheromone binding proteins: identification of PBP in the black cutworm moth, *Agrotis ipsilon*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 839 – 846.

Qiao HL, Tuccori E, He XL, Gazzano A, Field L, Zhou JJ, Pelosi P, 2009. Discrimination of alarm pheromone (*E*)-β-farnesene by aphid odorant-binding proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39: 414 – 419.

Rivière S, Lartigue A, Quennedey B, Campanacci V, Farine JP, Regoni M, Cambillau C, Brossut R, 2003. A pheromone-binding protein from the cockroach *Leucophaea maderae*: cloning, expression and pheromone binding. *Biochem. J.*, 371: 573 – 579.

Schmittgen TD, Livak KJ, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature*, 3: 1101 – 1108.

Song YQ, Xie XC, Dong JF, Wu JX, 2014. cDNA cloning, expression profiling and binding properties of odorant-binding protein GmolOBP3 in the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(3): 274 – 285. [宋月芹, 解幸承, 董钧峰, 仵均祥, 2014. 梨小食心虫气味结合蛋白 GmolOBP3 的 cDNA 克隆、表达谱及结合特性分析. 昆虫学报, 57(3): 274 – 285]

Sun HY, Yin J, Feng HL, Li KB, Xi JH, Cao YZ, 2011. Expression, purification and binding characteristics of general odorant-binding protein GmolOBP1 from the meadow moth, *Loxostege sticticalia* (Lepidoptera: Pyralididae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(4): 381 – 389. [孙红岩, 尹姣, 冯红林, 李克斌, 席景会, 曹雅忠, 2011. 草地螟普通气味结合蛋白(LstiGOBP1)蛋白表达纯化及结合特性分析. 昆虫学报, 54(4): 381 – 389]

Sun M, Liu Y, Wang G, 2013. Expression patterns and binding properties of three pheromone binding proteins in the diamondback moth, *Plutella xyllotella*. *J. Insect Physiol.*, 59: 46 – 55.

Vogt RG, Callahan FE, Rogers ME, Dickens JC, 1999. Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders, as indicated by LAP, an OBP2 related protein of the true bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera). *Chem. Senses*, 24: 481 – 495.

Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293: 161 – 163.

Wei D, Ye ZF, Gao JQ, Dong SL, 2013. Molecular cloning and functional identification of a Minus-C odorant binding protein from the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(7): 754 – 764. [魏丹, 叶占峰, 高建清, 董双林, 2002. 二化螟 Minus-C 气味结合蛋白的分子克隆及功能鉴定. 昆虫学报, 56(7): 754 – 764]

Witzgall P, Kirsch P, Cork A, 2010. Sex pheromones and their impact on pest management. *J. Chem. Ecol.*, 36: 80 – 100.

Xiu WM, Zhou YZ, Dong SL, 2008. Molecular characterization and expression pattern of two pheromone-binding proteins from *Spodoptera litura* (Fabricius). *J. Chem. Ecol.*, 34: 487 – 498.

Xu KZ, Wang MH, Ma L, Li GS, Mei C, Li B, Wei ZG, Xu YX, Shen WD, Chen YH, 2013. Generation of polyclonal antibody for *Bombyx mori* pheromone-binding protein1 (BmPBP1). *Adv. Mater. Res.*, 796: 15 – 20.

Xu YL, He P, Zhang L, Fang SQ, Dong SL, Zhang YJ, Li F, 2009. Large-scale identification of odorant-binding proteins and chemosensory proteins from expressed sequence tags in insects. *BMC Genomics*, 10: 632 – 644.

Zhang ZC, Wang MQ, Zhang G, 2009. Molecular cloning and expression of pheromone-binding protein1 from the diamondback moth, *Plutella xyllotella*. *Entomol. Exp. Appl.*, 133: 136 – 145.

Zhou JJ, Robertson G, He XL, Dufour S, Hooper AM, Pickett JA, Keep NH, Field LM, 2009. Characterisation of *Bombyx mori* odorant-binding proteins reveals that a general odorant-binding protein discriminates between sex pheromone components. *J. Mol. Biol.*, 389: 529 – 545.

(责任编辑: 袁德成)